



⑪ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑬ **DE 199 63 198 A 1**

⑮ Int. Cl.⁷:
C 12 Q 1/37
C 12 N 11/12
C 12 M 1/40

⑰ Aktenzeichen: 199 63 198.0
⑱ Anmeldetag: 27. 12. 1999
⑲ Offenlegungstag: 20. 9. 2001

DE 199 63 198 A 1

⑲ Anmelder:
Schulz-Schaeffer, Walter, Dr., 22175 Hamburg, DE
⑲ Vertreter:
Fiedler, J., Dipl.-Ing. Dr.rer.biol.hum., Pat.-Anw.,
37176 Nörten-Hardenberg

⑲ Erfinder:
Erfinder wird später genannt werden

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑳ Verfahren zum topographischen Proteinnachweis an formalinfixierten Gewebeschnitten

㉑ Verfahren zur Überführung von Proteinen zu deren Nachweis aus einem formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitt auf eine Membran mit einer Ober- und einer Unterseite unter Beibehaltung der relativen topographischen Positionen der Proteine zueinander bzw. im Gewebeschnitt, wobei die Art und Reihenfolge die folgenden Verfahrensschritte durchgeführt werden:
a) Platzierung und Ausbreitung des Gewebeschnitts auf der Oberseite der Membran,
b) Entparaffinierung und Trocknung des Gewebeschnitts auf der Membran,
c) Inkubation des Gewebeschnitts mit einer Proteaselösung, wobei
ci) die Proteaselösung mit Abstand von der Oberseite der Membran und dem Gewebeschnitt jenseits der Unterseite der Membran angeordnet ist und vermittels einer Schicht aus saugfähigem, mit der Proteaselösung durchfeuchtem Material mit der Unterseite der Membran in Kontakt gebracht wird, und wobei
cii) der Gewebeschnitt periodisch mit Proteaselösung beträufelt bzw. überschichtet wird,
d) Waschen der Membran,
e) Inkubation der Membran mit Proteindenaturierungsmittel.
Ober- und Unterseite aufweisende Membran mit auf der Oberseite angeordneten Proteinen aus einem Gewebeschnitt, wobei die die topographische Anordnung der Proteine auf der Membran der ursprünglichen topographischen Anordnung im Gewebeschnitt entspricht, und wobei die Membran mit einem Verfahren nach Anspruch 1 hergestellt ist.

Vorrichtung zur Durchführung eines Verfahrens nach Anspruch 1, wobei sie ein Gehäuse ...

DE 199 63 198 A 1

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Überführung von Proteinen zu deren Nachweis aus einem formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitt auf eine Membran mit einer Ober- und Unterseite unter Beibehaltung der relativen topographischen Positionen der Proteine zueinander bzw. im Gewebeschnitt.

Die Erfindung betrifft weiterhin eine eine Ober- und Unterseite aufweisende Membran mit auf der Oberseite angeordneten Proteinen aus einem Gewebeschnitt.

Die Erfindung betrifft weiterhin eine Vorrichtung zur Durchführung eines Verfahrens zur Überführung von Proteinen zu deren Nachweis aus einem formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitt.

Das Verfahren, die Vorrichtung zu seiner Durchführung und die Membran sind vor allem für den Einsatz in Verfahren zum immunhistochemischen, semiquantitativen, topographischen Nachweis von Proteinen in formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Geweben vorgesehen und geeignet.

Der immunhistochemische Nachweis von Proteinen, die an eine Membran gebunden sind, ist im Stand der Technik sowohl als Teil des Westernblot- als auch als Teil des Histoblot-Verfahrens bekannt. Beim Westernblot-Verfahren werden in wässriger Lösung befindliche Proteine zunächst in einem Polyacrylamidgel gemäß ihrer Lauf Eigenschaften in einem elektrischen Feld aufgetrennt, in einem zweiten Schritt mittels eines zweiten elektrischen Feldes aus dem Gel heraus auf eine Membran übertragen und auf dieser Membran in einem dritten Schritt einer Immunhistochemischen Nachweisreaktion (mit geeigneten Antikörpern) unterworfen. Beim Histoblot-Verfahren wird ein 5–10 µm dünner Gewebeschnitt aus nativ tiefgefrorenem Gewebe auf eine Nitrocellulosemembran aufgebracht und das Gewebe lysiert, worauf die in dem Gewebe enthaltenen Proteine daraus freigesetzt werden und an der Nitrocellulosemembran anhaften. Mittels einer immunhistochemischen Nachweisreaktion wird die topographische Verteilung der nachzuweisenden Proteine im Gewebekontext erkennbar.

Das Histoblot-Verfahren hat gegenüber dem Westernblot-Verfahren den Vorteil, dass die Proteine einerseits ihrer natürlichen topographischen Position im Gewebe zugeordnet werden können und andererseits durch das Herauslösen aus dem Gewebe und Immobilisieren an einer Nitrocellulosemembran weiteren chemischen (Vor)Behandlungen, insbesondere Aufschlussreaktionen, unterworfen werden können, die eine sensitivere Detektion im Zuge der immunhistochemischen Nachweisreaktion ermöglichen.

Beide bekannten Verfahren eignen sich jedoch gar nicht für den topographischen und spezifischen Nachweis von denaturierten Proteinen in formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Geweben. Die Formalinfixierung und Einbettung in Paraffin ist aber seit Jahren die Standardmethode zur Konservierung von Biopsie- und Autopsieproben in der Pathologie. Das heißt: Für die allermeisten archivierten Gewebeproben gibt es bisher außer der konventionellen Immunhistochemie kein Proteinachweisverfahren, das hinsichtlich Sensitivität, Spezifität und Topographie der betreffenden Proteine befriedigende Ergebnisse liefert.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist deshalb die Bereitstellung eines Verfahrens, das die Durchführung eines sensitiven und topographischen Nachweises von spezifischen Proteinen in Geweben, welche in Formalin fixiert wurden und in Paraffin eingebettet sind, ermöglicht.

Eine Lösung dieser Aufgabe besteht in der Bereitstellung eines Verfahrens zur Überführung von Proteinen aus einem formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebe-

schnitt auf eine Membran mit einer Ober- und einer Unterseite unter Beibehaltung der relativen, topographischen Positionen der Proteine zueinander bzw. im Gewebeschnitt, das durch die Art und Reihenfolge der folgenden Verfahrensschritte gekennzeichnet ist:

- a) Platzierung und Ausbreitung des Gewebeschnitts auf der Oberseite der Membran,
- b) Entparaffinierung und Trocknung des Gewebeschnitts auf der Membran,
- c) Inkubation des Gewebeschnitts mit einer Protease-lösung (Peptidase-Lösung, Proteinase-Lösung), wobei
 - ci) die Protease-Lösung mit Abstand von der Oberseite der Membran und dem Gewebeschnitt jenseits der Unterseite der Membran angeordnet ist und vermittels einer Schicht aus saugfähigem, mit der Protease-Lösung durchfeuchtem Material mit der Unterseite der Membran in Kontakt gebracht wird, und wobei
 - ci) der Gewebeschnitt nur periodisch, d. h. in zeitlichen Abständen, mit Protease-Lösung beaufschlagt bzw. überschichtet wird,
- d) Waschen der Membran, und
- e) Inkubation der Membran mit Proteindenaturierungsmittel.

Danach erfolgt der Proteinachweis auf der Membran mit bekannten Nachweismethoden.

Bei der Membran handelt es sich vorzugsweise um eine Nitrocellulosemembran; es kann aber auch eine andere geeignete Membran eingesetzt werden.

Eine weitere Lösung der genannten Aufgabe besteht in der Bereitstellung einer Membran mit einer Ober- und einer Unterseite, die auf der Oberseite angeordnete Proteine aus einem Gewebeschnitt aufweist, und die dadurch charakterisiert ist, dass die topographische Anordnung der Proteine auf der Membran der ursprünglichen topographischen Anordnung dieser Proteine im Gewebeschnitt entspricht, und dass die Membran mit dem vorstehend genannten, erfindungsgemäßen Verfahren herstellbar bzw. hergestellt ist.

Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens und zur Herstellung der erfindungsgemäßen Membran wird eine Vorrichtung vorgeschlagen, die sich durch die nachfolgend genannten Merkmale dadurch auszeichnet, dass sie ein Gehäuse mit Boden, Wandung und ohne oder mit abnehmbarem Deckel aufweist, dass an dem Boden eine Schicht aus saugfähigem Material angeordnet ist, deren Außenfläche so gewölbt sind, dass die Schicht bei annähernd mittlerer Anordnung auf dem Boden einen Abstand zur Wandung aufweist, und deren vom Gehäuseboden wegweisende Oberfläche als Träger für eine Membran geeignet ist, und dass am Boden eine Protease-Lösung mit Abstand von der Oberfläche der Membran angeordnet ist, die die Schicht durchfeuchtet bzw. von dem saugfähigen Material der Schicht aufgenommen ist.

Infolgedessen steht die dieser Schicht aufliegende Membran ebenfalls in Kontakt mit der Protease-Lösung und wird bzw. ist von dieser durchfeuchtet bzw. durchtränkt, und das selbe gilt letztendlich auch für den auf der Membran angeordneten Gewebeschnitt.

Die Schicht aus saugfähigem Material kann sowohl einlagig als auch mehrlagig sein, und im Fall von mehreren Lagen können die einzelnen Lagen aus dem gleichen oder aus verschiedenen saugfähigen Material(en) bestehen.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren bzw. mit der damit hergestellten erfindungsgemäßen Membran ist es erstmals möglich, auch in formalinfixierten und in Paraffin oder ähnlichen Wachsen eingebetteten Geweben denaturierte

Proteine nicht nur qualitativ sondern auch quantitativ und topographisch nachzuweisen, indem nämlich einfach die erfindungsgemäße Membran mit den darauf angeordneten Proteinen einem beliebigen immunhistochemischen Nachweisverfahren unterworfen wird. Dadurch hat das erfindungsgemäße Verfahren eine höhere Sensitivität als herkömmliche immunhistochemische Verfahren. Hierfür kommen insbesondere sämtliche im Stand der Technik bekannten und geläufigen immunhistochemischen Nachweisverfahren in Betracht. Damit geht insbesondere der Vorteil einher, dass jetzt auch solche Gewebeproben hinsichtlich bestimmter Proteine untersucht werden könnten, die schon vor vielen Jahren in Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und bis heute archiviert wurden. Derartige Untersuchungen sind vor allem in der Erforschung und Diagnose von neurodegenerativen Erkrankungen, die mit einer Ablagerung von Einweißstoffen (Proteinen) im Gehirn einhergehen, von großer Bedeutung. Hierzu zählen insbesondere Prionkrankheiten, wie z. B. der Creutzfeld-Jakob-Erkrankung, der Träberkrankheit (Scrapie), dem Rinderwahnsinn (BSSE) und die tödliche familiäre Schlaflosigkeit (Fetal Familial Insomnia = FFI) oder Krankheiten wie Morbus Alzheimer (bei der es zu einer Akkumulation von A-beta-Amyloid im Gehirn kommt).

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist es unter anderem erstmals gelungen, in Gewebeschneiden von an FFI erkrankten Patienten die topographische Verteilung von PrP^{Sc} (Prionprotein mit der Scrapie-Isomform) darzustellen.

Weitere Einzelheiten der Erfindung ergeben sich aus der nachfolgenden, ausführlichen Beschreibung anhand von Ausführungsbeispielen und der beigefügten Zeichnung.

Hierbei zeigt:

Fig. 1 eine erfindungsgemäße Inkubationskammer zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens.

Die in Fig. 1 dargestellte Inkubationskammer 2 besteht aus einem wannenförmigen Gehäuse 4 mit einem abnehmbaren Deckel 6. Am Boden 8 des Gehäuses 4 ist eine Schicht 10 aus saugfähigem Material 12, beispielsweise aus Zellulosestoff, angeordnet. Diese Schicht 10 kann – wie hier dargestellt – einlagig sein; sie kann aber ebenso gut auch aus mehreren Lagen bestehen, wobei die einzelnen Lagen dann aus dem gleichen oder aus verschiedenen saugfähigen Materialien bestehen können. Die Außenmaße der Schicht 10 sind so gewählt, dass sie bei mittlerer Anordnung auf dem Gehäuseboden 8 an allen ihren Rändern 12 einen Abstand zur Gehäusewand 14 einhalten kann. Der Boden 8 des Gehäuses 4 ist mit einer (Proteasenlösung, Peptidaselösung, Proteinaseelösung) 16 bedeckt, die außerdem die Schicht 10 durchfeuchtet bzw. die von dem saugfähigen Material dieser Schicht 10 aufgenommen ist. Auf der vom Gehäuseboden 8 wegweisenden Oberfläche 18 der Schicht 10 ist eine Nitrocellulosemembran 20 angeordnet, die auf ihrer von der Schicht 10 wegweisenden Oberfläche 22 einen Gewebeschchnitt 24 aus formalinfixiertem und ursprünglich in Paraffin eingebettetem, nachträglich wieder deparaffiniertem Material trägt. Die dem Gewebeschchnitt 24 abgewandte Oberfläche 26 der Nitrocellulosemembran 20 liegt der mit Enzymlösung 16 be- oder durchfeuchteten Schicht 10 vollständig auf und ist infolgedessen ebenfalls von der Enzymlösung 16 befeuchtet oder durchtränkt. Der Gewebeschchnitt 24 wiederum liegt der Nitrocellulosemembran 20 vollständig auf und steht auf diese Art und Weise ebenfalls in Kontakt mit der Enzymlösung 16.

Wird nun der Gewebeschchnitt 24 zusätzlich mit Enzymlösung 16 beträufelt bzw. überschichtet, so wandert die so aufgetragene Flüssigkeit durch den Gewebeschchnitt 24 hindurch zur Nitrocellulosemembran 20, durch diese hindurch zur Schicht 10 und von dort aus ggf. zur freien Flüssigkeit in

den Randbereichen des Gehäuses 4 zwischen Gehäusewand 14 und Schicht 10. Um diesen erfindungsgemäßen Flüssigweg der Enzymlösung 16 zu gewährleisten, sollte der Flüssigkeitspiegel 28 der Enzymlösung 16 immer unterhalb der vom Gehäuseboden 8 wegweisenden Oberfläche 18 der Schicht 10 liegen.

Beispiel 1

10 Immunhistochemischer (semiquantitativer) topographischer Nachweis von Proteinen in formalinfixiertem und in Paraffin eingebetteten Geweben

Von einem formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebe wird ein Gewebeschchnitt hergestellt, auf eine Nitrocellulosemembran aufgebracht und zusammen mit dieser getrocknet.

Der Gewebeschchnitt auf der Nitrocellulosemembran wird entparaffiniert, in die wässrige Phase überführt und getrocknet.

20 Die Nitrocellulosemembran mit dem Gewebeschchnitt wird mit einer Proteasenlösung (Peptidaselösung, Proteinaseelösung) inkubiert. Dabei ist diese Proteasenlösung an der Seite der Nitrocellulosemembran angeordnet, die dem Gewebeschchnitt abgewandt ist, und sie steht mit der Oberfläche dieser Seite (d. h. mit der dem Gewebeschchnitt abgewandten Oberfläche) entweder direkt oder indirekt, nämlich vermittelt einer Schicht aus saugfähigem, mit der Proteasenlösung durchfeuchtem Material, in Kontakt.

30 Die dem Gewebeschchnitt zugewandte Oberfläche der Nitrocellulosemembran und der Gewebeschchnitt selbst wird von der angeordneten Proteasenlösung bzw. von dem mit dieser Proteasenlösung durchfeuchteten Material beabstandet bzw. gehalten.

35 Ein- oder mehrmalig in zeitlichen Abständen wird der Gewebeschchnitt mit Proteasenlösung beträufelt bzw. überschichtet, so dass der Flüssigweg dieser aufgeträufelten bzw. überschichteten Proteasenlösung durch den Gewebeschchnitt hindurch zur Nitrocellulosemembran und durch diese hindurch ggf. zu dem durchfeuchteten Material und durch dieses hindurch zur angeordneten Proteasenlösung verläuft.

40 Zur Durchführung dieser Inkubation (des Gewebeschchnitts auf der Nitrocellulosemembran mit einer Proteasenlösung) eignet sich insbesondere eine Inkubationskammer gemäß Fig. 1 und dazugehöriger Beschreibung.

45 Nach ausreichender Inkubationsdauer, die von der Art und der zu überführenden Proteine und der Art der Proteasenlösung abhängt und für einen Fachmann ohne weiteres ermittelbar ist, wird die Nitrocellulosemembran gewaschen und danach mit einem Proteindenaturierungsmittel inkubiert.

Anschließend wird die Nitrocellulosemembran nochmals gewaschen und ist dann einsatzbereit, beispielsweise und insbesondere für eine immunhistochemische Nachweisreaktion.

Beispiel 2

50 Immunhistochemischer Nachweis der Scrapie-Isomform des Prionproteins (PrP^{Sc}) in formalinfixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe

Von einem formalinfixierten, bei Verdacht auf CJD Ameisensäuredekontaminiertem und in Paraffin eingebettetem (paraffindurchtränkt) Gewebeschchnitt wird mittels einem, dem Fachmann bekannten und geläufigen Mikrotom ein etwa 5–7 µm dicker Gewebeschchnitt abgeschnitten und auf eine Wasseroberfläche (Wassertemperatur ca. 40°C) aufge-

bracht. Eine handelsübliche Nitrocellulosemembran (beispielsweise von der Fa. Biorad) mit einer Porengröße von beispielsweise 0,45 µm wird auf einen handelsüblichen Glasobjektträger aufgelegt und im Wasserbad angefeuchtet. Anstelle der Nitrocellulosemembran kann auch eine andere geeignete Membran zum Einsatz kommen. Der schwimmende Gewebeschchnitt wird mit der dem Objektträger aufliegenden Nitrocellulosemembran von der Wasseroberfläche abgenommen.

Objektträger und Membran mit aufliegendem Gewebeschchnitt werden auf einer Wärmeplatte bei ca. 50°C für etwa 1 Minute angewärmt so daß sich der Gewebeschchnitt streckt, und das Restwasser zwischen Gewebeschchnitt und Nitrocellulosemembran wird vorzugsweise mit Zellstoff bzw. Filterpapier abgesaugt. Anschließend wird der Gewebeschchnitt auf der Nitrocellulosemembran und dem Objektträger im Wärmeschrank bei ca. 55°C für mindestens 30 Minuten getrocknet. Nach der Trocknung kann die Nitrocellulosemembran mit dem darauf liegenden Gewebeschchnitt von dem Objektträger abgenommen und entweder direkt weiter behandelt oder bis zur Weiterbehandlung gelagert werden.

Für die Weiterbehandlung wird der der Nitrocellulosemembran aufliegende Gewebeschchnitt zunächst entfärbt, beispielsweise durch Inkubieren in Xylol für 2 x 5 Minuten, nachfolgendem Auswaschen des Xylols mit 100% Vol/Vol Isopropanol und abschließendem schrittweisen Einsetzen des Isopropanols durch Wasser im Wege eines Durchlaufs durch eine absteigende Isopropanol-in-Wasser-Verdünnungsreihe. Die letzte Stufe der Verdünnungsreihe, nämlich das 100%ige Aqua bidest, wird vorzugsweise mit einem Tensid, beispielsweise 0,1% Tween 20 versetzt.

Danach wird der Gewebeschchnitt auf der Nitrocellulosemembran getrocknet und kann anschließend entweder direkt dem Nachweisverfahren unterworfen oder bis zur Weiterbehandlung gelagert werden.

Für den erfindungsgemäßen Nachweis beispielsweise der Scrapie-Isoform des Prionoproteins (PrP^{Sc}) wird der Gewebeschchnitt auf der Nitrocellulosemembran zunächst mit Proteinase K verdaut. Dazu wird die Nitrocellulosemembran und dem darauf liegenden Gewebeschchnitt zunächst in TBST (10 mM TrisHCl, pH 7,8; 100 mM NaCl; 0,05% Tween 20) eingeweicht und anschließend für die Dauer von ca. 8 Stunden in einer geschlossenen Inkubationskammer bei ca. 55°C auf einer Unterlage aus saugfähigem Material, beispielsweise einer oder mehreren Zelluloselagen, inkubiert, die mit einer Lösung aus handelsüblicher Proteinase K (z.B. Fa. Sigma) in PK-Puffer (10 mM TrisHCl pH 7,8; 100 mM NaCl; 0,1% Brij 35) in der Konzentration 250 µg/ml getränkt ist. Während der Inkubationsdauer wird der Gewebeschchnitt mehrmals mit Proteinase-K-Lösung benetzt, z.B. durch Betropfen oder Übersichten. Dabei wird die für die Benetzung vorgesehene Menge an Proteinase-K-Lösung so gering gewählt, daß die zugegebene Flüssigkeit von der Unterlage, beispielsweise der(den) Zelluloselage(n), praktisch vollständig aufgesaugen werden kann und kein Flüssigkeitspiegel entsteht, der die Ebene, in der die Nitrocellulosemembran mit dem Gewebeschchnitt liegt, übersteigt. Mit anderen Worten: Während die saugfähige Unterlage, beispielsweise die Zelluloselage(n), ganz oder zumindest teilweise in der Proteinase-K-Lösung liegt bzw. liegen darf, bleibt die Nitrocellulosemembran mit dem aufliegenden Gewebeschchnitt immer oberhalb des Flüssigkeitspiegels der Proteinase-K-Lösung angeordnet und wird – ausgenommen beim planmäßigen Benetzen – nicht von der Lösung bedeckt. Unter diesen Inkubationsbedingungen werden die durch den enzymatischen Verdau des Gewebeschchnittes mobilisierten Proteine in die Nitrocellulosemembran überführt (bzw. transferiert bzw. "geblotter").

Im Anschluß an die Inkubation mit Proteinase-K-Lösung wird die Nitrocellulosemembran (samt dem weitgehend verdauten Gewebeschchnitt) 3 x 5 Minuten zunächst in TBST gewaschen und anschließend für 10–20 Minuten bei Raumtemperatur in 4 M Guanidinium(iso)thiocyanatlösung (GdnSCH) in 10 mM TrisHCl pH 7,8 inkubiert, um die Proteine in der Nitrocellulosemembran zu denaturieren. Danach wird das GdnSCH mit TBST 3 x 5 Minuten ausgewaschen und die Nitrocellulosemembran in 0,2% Casein in TBST als Blockingreagenz (zum Blockieren, d. h. Besetzen unspezifischer Bindungsstellen für den nachfolgend zu Einsatz kommenden primären Antikörper) für ca. 30 Minuten inkubiert. Anschließend wird die Nitrocellulosemembran mit einem primären Antikörper, der gegen das Prionprotein gerichtet ist, beispielsweise der im Handel erhältliche Antikörper BP4 (Firma dako) für 1–12 Stunden inkubiert. Hierfür wird der Antikörper mit Blockingreagenz auf die Antikörper-spezifische Konzentration, die im Stand der Technik üblicherweise für Westernblot-Immunreaktionen eingesetzt wird, verdünnt.

Bei Inkubationszeiten von mehr als 3 Stunden wird diese bei ca. 4°C durchgeführt, sonst bei Raumtemperatur.

Im Anschluß an diese Inkubation mit dem primären Antikörper wird die Nitrocellulosemembran 3 x 10 Minuten in TBST gewaschen und danach mit dem sekundären Antikörper in der vom Hersteller angegebenen Verdünnung mit Blockingreagenz für 1–12 Stunden unter den gleichen Inkubationsbedingungen wie bei dem Primärantikörper inkubiert. Als sekundärer Antikörper dient beispielsweise im Fall von einem monoklonalen Primärantikörper aus einer Maus ein mit dem Enzym "Alkalische Phosphatase" gekoppelter Ziege-Anti-Maus-Antikörper (z.B. von Fa. Dako, D0486), oder im Fall eines polyklonalen Primärantikörpers aus einem Kaninchen ein Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper. In jedem Fall sollten die sekundären Antikörper aufgereinigt sein, um unerwünschte, unspezifische Hintergrundreaktionen zu vermeiden.

Zum Sichtbarmachen der Immunreaktion wird die Nitrocellulosemembran einer Farbreaktion unterworfen. Hierfür wird die Nitrocellulosemembran zunächst 5 x 10 Minuten mit TBST gründlich gewaschen. Danach wird die Nitrocellulosemembran durch 2 x 5 Minuten Inkubation in NTM (100 mM TrisHCl pH 9,5; 100 mM NaCl; 50 mM MgCl₂) auf einen basischen pH eingestellt. Für die eigentliche Farb-reaktion wird die Nitrocellulosemembran anschließend für 7–75 Minuten (je nach Primärantikörper) einer Formazan-Reaktion mit 45 µl NTB (75 mg/ml) und 33 µl BCIP (50 mg/ml) in 10 ml NTM bei 4°C im Dunklen unterworfen. Im Anschluß an die Farbreaktion wird das Farbreagenz mit PBS (= Phosphat-Puffer-Lösung) ausgewaschen und die Nitrocellulosemembran in destilliertem Wasser von Salzkristallen und Formazanresten gereinigt. Alle Reaktionsschritte werden auf einem Taumler durchgeführt.

Die Auswertung der Nachweisreaktion erfolgt unter einer Stereolupe nach dem Trocknen der Nitrocellulosemembran.

Für den Nachweis anderer Proteine als der Scrapie-Isoform des Prionoproteins (PrP^{Sc}) wird das gleiche Verfahren unter Verwendung entsprechend anderer Enzyme anstelle von Proteinase K durchgeführt. In der Praxis gut bewährt hat sich vor allem auch der Verdau mit Protease (1 mg/ml; z.B. Fa. Sigma) oder ein Doppelverdau mit Protease (1 mg/ml) und Proteinase K (250 µg/ml) bei bindegewebshaltigen Gewebeschritten (Gewebe außerhalb des zentralen Nervensystems).

Bezugszeichenliste

2 Inkubationskammer

4 Gehäuse
6 Gehäuse
8 Boden
10 Schicht
12 saugfähiges Material
14 Gehäusewand
16 Verdauungsenzymlösung
18 Oberfläche der Schicht
20 Nitrocellulosemembran
22 Oberfläche
24 Gewebeschnitt
26 Oberfläche
28 Flüssigkeitsspiegel

Patentansprüche

15

1. Verfahren zur Überführung von Proteinen zu deren Nachweis aus einem formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitt auf eine Membran mit einer Ober- und einer Unterseite unter Beibehaltung der relativen topographischen Positionen der Proteine zueinander bzw. im Gewebeschnitt, **gekennzeichnet** durch Art und Reihenfolge der folgenden Verfahrensschritte:

20

- a) Platzierung und Ausbreitung des Gewebeschnitts auf der Oberseite der Membran,
- b) Entparaffinierung und Trocknung des Gewebeschnitts auf der Membran,
- c) Inkubation des Gewebeschnitts mit einer Proteaselösung, wobei
 - ci) die Proteaselösung mit Abstand von der Oberseite der Membran und dem Gewebeschnitt jenseits der Unterseite der Membran angeordnet ist und vermittels einer Schicht aus saugfähigem, mit der Proteaselösung durchfeuchtem Material mit der Unterseite der Membran in Kontakt gebracht wird, und
 - cii) der Gewebeschnitt periodisch mit Proteaselösung beträufelt bzw. überschichtet wird,

25

30

35

40

- d) Waschen der Membran,
- e) Inkubation der Membran mit Proteindenaturierungsmittel.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Membran eine Nitrocellulosemembran oder eine andere geeignete Membran ist.

45

3. Ober- und Unterseite aufweisende Membran mit auf der Oberseite angeordneten Proteinen aus einem Gewebeschnitt, dadurch gekennzeichnet, dass die topographische Anordnung der Proteine auf der Membran der ursprünglichen topographischen Anordnung im Gewebeschnitt entspricht, und dass die Membran mit einem Verfahren nach Anspruch 1 hergestellt ist.

50

4. Vorrichtung zur Durchführung eines Verfahrens nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sie ein Gehäuse (4) mit Boden (8), Wandung und ohne oder mit abnehmbarem Deckel aufweist, daß an dem Boden (8) eine Schicht (10) aus saugfähigem Material (12) angeordnet ist, deren Außenmaße so gewählt sind, dass die Schicht (10) bei annähernd mittlerer Anordnung auf dem Boden (8) einen Abstand zur Wandung (14) aufweist, und deren vom Gehäuseboden wegweisende Oberfläche (18) als Träger für eine Membran (20) geeignet ist, und dass am Boden (8) eine Proteaselösung (16) mit Abstand von der Oberfläche (18) der Membran (20) angeordnet ist, die die Schicht (10) durchfeuchtet bzw. von dem saugfähigen Material der

55

60

65

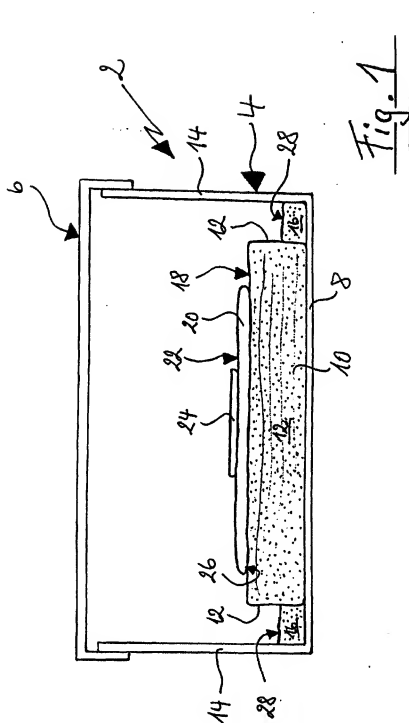
Schicht (10) aufgenommen ist.

5. Vorrichtung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Gehäuse (4) wannenförmig ist.

6. Vorrichtung nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Schicht (10) einlagig ist.

7. Vorrichtung nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Schicht (10) aus mehreren Lagen besteht, wobei die einzelnen Lagen aus dem gleichen oder aus verschiedenen saugfähigen Material(en) bestehen.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen



[Original document](#)

Diagnosing neurodegenerative disease, e.g., Creutzfeld-Jakob disease and Bovine Spongiform Encephalopathy, on formalin-fixed tissue sections comprises spreading and cleaning a tissue sample on membrane for incubation with protease solution

Publication number: DE19963198

Publication date: 2001-09-20

Inventor:

Applicant: SCHULZ SCHAEFFER WALTER (DE)

Classification:

- international: **C12Q1/37; G01N33/68; C12Q1/37; G01N33/68; (IPC1-7): C12Q1/37; C12M1/40; C12N11/12**

- European:

Application number: DE19991063198 19991227

Priority number(s): DE19991063198 19991227

[View INPADOC patent family](#)[View list of citing documents](#)[Report a data error here](#)

Abstract of DE19963198

A tissue section (I) is spread out on the upper side of a membrane (II). The paraffin wax is removed and (I) is dried on (II), then incubated with a protease solution (III). An absorbent layer soaked with (III) is brought into contact with the underside of (II). Periodically, (III) is trickled over (I), or coated over it. (II) is washed and finally incubated with protein denaturing agent. Independent claims are also included for the following: (1) a membrane with proteins from a tissue section arranged on its upper surface. Topological arrangement of proteins on the membrane corresponds with the original topological arrangement in the tissue section, the membrane having been prepared as described; and (2) an apparatus comprising a casing (4), base (8) and optional removable cover (6). On the base (8) a layer (10) of absorbent material (12) is arranged, dimensioned for central arrangement with spacing from the wall (14). Its upper surface (18) carries the membrane (20). The protease solution (16) at the base, soaks the absorbent. Preferred features: The casing is trough-shaped. The layer is single or multilayer, comprising the same, or different absorbent materials.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

Description of DE19963198

[Translate this text](#)

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Überführung von Proteinen zu deren Nachweis aus einem formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitt auf eine Membran mit einer Ober- und Unterseite unter Beibehaltung der relativen topographischen Positionen der Proteine zueinander bzw. in